

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

B1

(11)Publication number : 2001-226376

(43)Date of publication of application : 21.08.2001

(51)Int.Cl. C07D471/06

C12M 1/00

C12N 15/09

C12Q 1/68

G01N 27/327

G01N 27/416

G01N 33/483

G01N 33/58

// C12M 1/34

(21)Application number : 2000-375019

(71)Applicant : FUJI PHOTO FILM CO LTD

(22)Date of filing : 08.12.2000

(72)Inventor : MAKINO YOSHIHIKO
TAKAHASHI KAZUNOBU
TAKAGI MAKOTO
TAKENAKA SHIGEORI
YAMASHITA KENICHI

(30)Priority

Priority number : 11349284 Priority date : 08.12.1999 Priority country : JP

(54) STITCH IN-TYPE INTERCALATOR HAVING OXIDATION-REDUCTION ACTIVITY

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a compound useful as a new electrochemically active

stitch in-type intercalator capable of being especially effectively used for electrochemically detecting the complementarity of a nucleic acid fragment specimen.

SOLUTION: This compound useful as the electrochemically active stitch in-type intercalator is represented by the formula $Ea \cdot La \cdot X \cdot Lb \cdot Eb$ (wherein Ea and Eb exhibit oxidation-reduction activity and also are each a group containing a conjugated system; X is a divalent cyclic group; and La and Lb are a connector group not forming respective conjugated systems extending from the conjugated systems Ea and b, and at least one of La and Lb is a connector group having a site imparting water solubility to the above compound or a site capable of being converted into a water solubility-imparting site).

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号
特開2001-226376
(P2001-226376A)

(43)公開日 平成13年8月21日(2001.8.21)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード*(参考)
C 0 7 D 471/06		C 0 7 D 471/06	
C 1 2 M 1/00		C 1 2 M 1/00	A
C 1 2 N 15/09		C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68		G 0 1 N 33/483	F
G 0 1 N 27/327		33/58	A
審査請求 未請求 請求項の数22 O L (全 13 頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願2000-375019(P2000-375019)	(71)出願人	000005201 富士写真フイルム株式会社 神奈川県南足柄市中沼210番地
(22)出願日	平成12年12月8日(2000.12.8)	(72)発明者	牧野 快彦 埼玉県朝霞市泉水3-11-46 富士写真フイルム株式会社内
(31)優先権主張番号	特願平11-349284	(72)発明者	高橋 和信 神奈川県南足柄市中沼210番地 富士写真フイルム株式会社内
(32)優先日	平成11年12月8日(1999.12.8)	(72)発明者	高木 誠 福岡県福岡市博多区昭南町3-4-29
(33)優先権主張国	日本(J P)	(74)代理人	100074675 弁理士 柳川 泰男
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 酸化還元活性を有する縫い込み型インターカレータ

(57)【要約】

【課題】 核酸断片試料の相補性の電気化学的な検出において、特に有効に用いることができる新規な電気化学活性縫い込み型インターカレータとして有用な化合物を提供する。

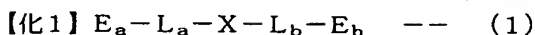
【解決手段】 電気化学活性縫い込み型インターカレータとして有用な下記式の化合物：

【化1】 $E_a-L_a-X-L_b-E_b$

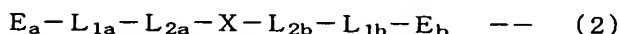
[E_a と E_b とは、酸化還元活性を示し、かつ共役系を含む基を表わし、 X は二価の環状基を表わし、そして L_a および L_b は、それぞれが E_a および E_b の共役系が延長される共役系を形成することのない連結基であって、少なくとも一方の連結基が、本化合物に水溶性を付与する部位を有する連結基もしくは水溶性を付与する部位に変換し得る部位を有する連結基である。]

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記式(1)で表わされる化合物：



〔ただし、 E_a および E_b は、互いに独立に、酸化還元活性を示し、かつ共役系を含む基を表わし、 X は二価の環状基を表わし、そして L_a および L_b は、互いに独立に、それぞれが E_a および E_b の共役系が延長される共役系を形成することのない連結基であって、少なくとも一方の連結基が、本化合物に水溶性を付与する部位を有する連結基もしくは水溶性を付与する部位に変換し得る部位を有する連結基である。〕



〔但し、 E_a および E_b は、互いに独立に、酸化還元活性を有し、かつ共役系を含む基を表わし、 L_{1a} および L_{1b} は、互いに独立に、それぞれが E_a および E_b の共役系が延長される共役系を形成しない基を表わし、 L_{2a} および L_{2b} は、互いに独立に、水溶性を付与する部位を有する連結基もしくは水溶性を付与する部位に変換し得る部位を有する連結基を表わし、そして X は二価の環状基を表わす。〕

【請求項6】 E_a および E_b が、互いに独立に、それぞれ置換基を有していてもよい、一もしくは二以上の結合手を持つメタロセン、2, 2'-ビピリジン錯体、シクロブタジエン錯体、シクロペンタジエニル錯体、1, 10-フェナントロリン錯体、トリフェニルホスフィン錯体、カテコールアミンおよびビオローゲンからなる群より選ばれる酸化還元活性基であることを特徴とする請求項1もしくは5に記載の化合物。

【請求項7】 L_{1a} および L_{1b} が、互いに独立に、置換基を有していてもよい炭化水素基であることを特徴とする請求項5に記載の化合物。

【請求項8】 L_{1a} および L_{1b} が、互いに独立に、置換基を有していてもよい炭素原子数が1乃至6のアルキレン基あるいは置換基を有していてもよい炭素原子数が2乃至6のアルケニレン基であることを特徴とする請求項5に記載の化合物。

【請求項9】 L_{2a} および L_{2b} が、互いに独立に、炭素元素以外の元素を含む連結基であることを特徴とする請求項5に記載の化合物。

【請求項10】 L_{2a} および L_{2b} が、互いに独立に、N、O、もしくはSを含む連結基であることを特徴とする請求項9に記載の化合物。

【請求項11】 L_{2a} および L_{2b} が、互いに独立に、それぞれ、置換基を有していてもよい、アミド結合基、エステル結合基、エーテル結合基、チオエーテル結合基、ジイミド結合基、チオジイミド結合基、チオアミド結合基、イミノ結合基、カルボニル結合基、チオカルボニル結合基および1, 4-ピペラジニル基からなる群より選ばれる基を含む連結基であることを特徴とする請求項10に記載の化合物。

【請求項2】 E_a と E_b 、そして L_a と L_b とが、それぞれ、互いに同一の基であることを特徴とする請求項1に記載の化合物。

【請求項3】 $L_a - X - L_b$ で表わされる連結部の主鎖の最短の結合路を構成する原子の数が10乃至100の間にある請求項1に記載の化合物。

【請求項4】 該結合路を構成する原子の数が15乃至70の間にある請求項3に記載の化合物。

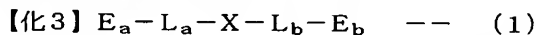
【請求項5】 下記式(2)で表わされる請求項1に従う化合物：

【化2】

【請求項12】 L_{2a} および L_{2b} が、互いに独立に、-NHCO-基、もしくは-CONH-基であることを特徴とする請求項10に記載の化合物。

【請求項13】 E_a と E_b 、 L_{1a} と L_{1b} 、そして L_{2a} と L_{2b} とがそれぞれ、互いに同一の基であることを特徴とする請求項5に記載の化合物。

【請求項14】 下記式(1)で表わされる酸化還元活性を有する縫い込み型インターカレータ：



〔但し、 E_a および E_b は、互いに独立に、酸化還元活性を示し、かつ共役系を含む基を表わし、 X は二価の環状基を表わし、そして L_a および L_b は、互いに独立に、それぞれが E_a および E_b の共役系が延長される共役系を形成することのない連結基であって、少なくとも一方の連結基が、本化合物に水溶性を付与する部位を有する連結基もしくは水溶性を付与する部位に変換し得る部位を有する連結基である。〕

【請求項15】 E_a と E_b 、そして L_a と L_b とが、それぞれ、互いに同一の基であることを特徴とする請求項14に記載の縫い込み型インターカレータ。

【請求項16】 $L_a - X - L_b$ で表わされる連結部の主鎖の最短の結合路を構成する原子の数が10乃至100の間にある請求項14に記載の縫い込み型インターカレータ。

【請求項17】 オリゴヌクレオチド試料もしくはポリヌクレオチド試料の分析のための電気化学的分析法に用いられる請求項14に記載の縫い込み型インターカレータ。

【請求項18】 電極基板の表面に備えられた一群のヌクレオチド誘導体もしくはその類縁体からなるプローブ分子と、該プローブ分子と相補的な関係にあるオリゴヌクレオチド試料もしくはポリヌクレオチド試料とを水性媒体と請求項14に記載の縫い込み型インターカレータの存在下でハイブリダイズさせて、該縫い込み型インターカレータが挿入された、該プローブ分子とオリゴヌクレオチド試料もしくはポリヌクレオチド試料との複合体を形成させる工程、そして上記電極基板に電位を付与

し、これにより発生する電流を検知する工程を含むオリ

ゴヌクレオチド試料もしくはポリヌクレオチド試料の分析方法。

【請求項 19】 電極基板の表面に備えられた一群のヌクレオチド誘導体もしくはその類縁体からなるプローブ分子と、該プローブ分子と相補的な関係にあるオリゴヌクレオチド試料もしくはポリヌクレオチド試料とを水性媒体の存在下でハイブリダイズさせ、次いで請求項 14 に記載の縫い込み型インターカレータを接触させることにより、該縫い込み型インターカレータが挿入された、該プローブ分子とオリゴヌクレオチド試料もしくはポリヌクレオチド試料との複合体を形成させる工程、そして上記電極基板に電位を付与し、これにより発生する電流を検知する工程を含むオリゴヌクレオチド試料もしくはポリヌクレオチド試料の分析方法。

【請求項 20】 電極基板に付与する電位が 100 乃至 400 mV の範囲内の電位であることを特徴とする請求項 18 もしくは 19 に記載の分析方法。

【請求項 21】 一群のヌクレオチド誘導体もしくはその類縁体からなるプローブ分子が備えられた電極基板、そして請求項 14 に記載の縫い込み型インターカレータとからなるオリゴヌクレオチド試料もしくはポリヌクレオチド試料の分析のための分析キット。

【請求項 22】 ヌクレオチド誘導体もしくはその類縁体が、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、もしくはペプチド核酸である請求項 21 に記載の分析キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、基板上に固定されたヌクレオチド誘導体もしくはその類縁体などのプローブ分子と相補性を有する核酸断片などのポリヌクレオチド試料もしくはオリゴヌクレオチド試料を電気化学的に検出する際に電気化学活性な縫い込み型インターカレータとして有利に用いることのできる化合物に関する。

【0002】

【従来の技術】 生物学や医学分野での遺伝子発現のモニタリング、核酸の塩基配列の決定、遺伝子変異解析、遺伝子多型解析等においては、特定の配列を有する核酸を検出する方法として、サザンハイブリダイゼーション法に代表されるハイブリダイゼーション法が用いられている。サザンハイブリダイゼーション法などの従来公知の方法では通常、標識として R I（放射性標識）が用いられている。ただし、サザンハイブリダイゼーション法では、R I の代わりに蛍光を用いる手法も知られている。

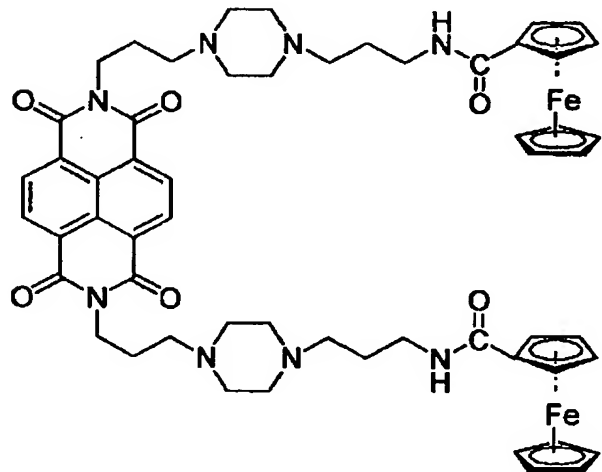
【0003】 近年、DNA 断片などのポリヌクレオチド試料あるいはオリゴヌクレオチド試料を、当該 DNA 断片と相補性を示すヌクレオチド誘導体もしくはその類縁体を基板表面に固定した検出用具（一般に、DNA チップあるいは DNA アレイと呼ばれている）を用い、その相補性を利用して、ハイブリダイゼーションにより、基板上に固定して、その塩基配列などの分析を行なう技術

が開発され、遺伝子の塩基配列の決定などの目的で利用されている。この DNA チップ（あるいは DNA アレイ）を用いる検出方法では、DNA 断片に蛍光標識を付して、ハイブリダイゼーションにより基板に固定された DNA 断片を検出する手段が利用されている。標識手段として蛍光を用いる方法は、蛍光の内部消光のために、一定以上の蛍光物質を標識として導入することは困難であるという欠点を有するものの、アトモルのレベルの極度に少ない量の DNA 断片試料の解析が可能な点で有効な方法であるとされている。

【0004】 一方、特開平 9-288080 号公報には、標識手段として導電性物質を使用する方法が開示されている。この方法によると、核酸断片などのヌクレオチド誘導体プローブ分子を電極表面に静電的に固定し、ここに、該ヌクレオチド誘導体に相補性を示す DNA 断片試料、そして酸化還元活性を有する下記式で表されるフェロセンカルボン酸 N-ヒドロキシスクシンイミドエステルで標識された導電性の縫い込み型インターカレータを接触させると、プローブ分子と DNA 断片試料とのハイブリダイゼーションによってらせん構造体などの複合体が形成され、その複合体の内部に導電性インターカレータが挿入されるため、電極に電位を印加すると、別に設けた対極と電極との間に導電性インターカレータを介して電流が流れるため、その電流量を測定することによって、ハイブリッドらせん構造体などの複合体の生成が検出できる。

【0005】

【化 4】



【0006】 上記の導電性縫い込み型インターカレータは、ナフタレンジイミド環状基をコア（中央核部分）とし、その両端部に鎖状のリンカー部分を有し、そして、リンカー部分の先端部には酸化還元活性を持ち、共役系を有する導電性フェロセン分子が付いている。

【0007】 電極上のプローブ分子に相補性を有する試料 DNA 断片の検出では、電極に電位を印加して得られる電流量は、プローブ分子、DNA 断片試料、測定緩衝

液の塩濃度等の条件によって若干変動するが、上記の導電性縫い込み型インターカレータを使用した場合には、流れる電流量は、約450乃至約620mVの範囲にある電位を印加した場合にピーク値を示すため、通常、そのピーク電流値を与える約450mVより高い電位を印加することによって行なわれる。

【0008】上記のピーク電流が発生する電位範囲の約450乃至約620mVは比較的高い値であるため、そのような電位を電極に与える測定装置の製造は、製造コスト面で不利になる。また、電極表面に静電結合などの比較的に弱い結合状態で固定されたプローブ分子は、高い電位の付与によって電極表面から離脱しやすくなるため、検出対象となるDNA断片試料の検出感度や検出精度の低下が問題となる。特に、プローブ分子を有する電極を、一旦結合したDNA断片試料とインターカレータとを離脱させたのち、同様の操作に繰り返し用いる場合には、検出感度や検出精度の低下が発生しやすい。

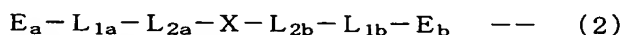
【0009】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、ヌクレオチド誘導体あるいはその類縁体が電極表面に固定されたDNAチップを用い、DNA断片試料などのポリヌクレオチド試料もしくはオリゴヌクレオチド試料を導電性縫い込み型インターカレータを利用して電気化学的に検出する操作の実施に於いて、相対的に低い電位の使用によっても高い検出感度や検出精度での検出操作を可能にする導電性縫い込み型インターカレータとして有用な化合物を提供することを主な課題とする。

【0010】

【課題を解決するための手段】本発明は、下記式(1)で表わされる化合物にある。

【0011】



【0017】[但し、 E_a および E_b は、互いに独立に、酸化還元活性を有し、かつ共役系を含む基を表わし、 L_{1a} および L_{1b} は、互いに独立に、それぞれが E_a および E_b の共役系が延長される共役系を形成しない基を表わし、 L_{2a} および L_{2b} は、互いに独立に、水溶性を付与する部位を有する連結基もしくは水溶性を付与する部位に変換し得る部位を有する連結基を表わし、そしてXは二価の環状基を表わす。]

【0018】 L_{1a} および L_{1b} は、互いに独立に、置換基を有していてもよい炭化水素基、特に、置換基を有していてもよい炭素原子数が1乃至6のアルキレン基あるいは置換基を有していてもよい炭素原子数が1乃至6のアルケニレン基であることが好ましい。

【0019】 L_{2a} および L_{2b} は、互いに独立に、炭素元素以外の元素(例、N、O、もしくはS)を含む連結基であることが好ましく、特に、置換基を有していてもよい、アミド結合基、エステル結合基、エーテル結合基、チオエーテル結合基、ジイミド結合基、チオジイミド結

【化5】 $E_a-L_a-X-L_b-E_b$ (1)

【0012】[ただし、 E_a および E_b は、互いに独立に、酸化還元活性を示し、かつ共役系を含む基を表わし、Xは二価の環状基を表わし、そして L_a および L_b は、互いに独立に、それぞれが E_a および E_b の共役系が延長される共役系を形成することのない連結基であって、少なくとも一方の連結基が、本化合物に水溶性を付与する部位を有する連結基もしくは水溶性を付与する部位に変換し得る部位を有する連結基である。]

【0013】上記式(1)において、 E_a と E_b 、そして L_a と L_b とが、それぞれ、互いに同一の基であることが好ましい。また、 L_a-X-L_b で表わされる連結部の主鎖の最短の結合路を構成する原子の数が10乃至100の間、なかでも15乃至70の間、特に20乃至50の間にあることが好ましい。なお、この連結部の主鎖の最短の結合路を構成する原子の数の計算を、前記のフェロセンカルボン酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステルに適用すると、その原子の数は32となる。

【0014】また、 E_a および E_b は、互いに独立に、それぞれ置換基を有していてもよい、一もしくは二以上の結合手を持つメタロセン、2, 2'-ビピリジン錯体、シクロブタジエン錯体、シクロペンタジエニル錯体、1, 10-フェナントロリン錯体、トリフェニルホスフィン錯体、カテコールアミンおよびビオローゲンからなる群より選ばれる酸化還元活性基であることが好ましい。

【0015】上記式(1)の化合物は、特に下記式(2)で表わされる化合物であることが好ましい。

【0016】

【化6】

合基、チオアミド結合基、イミノ結合基、カルボニル結合基、チオカルボニル結合基および1, 4-ピペラジニル基からなる群より選ばれる基を含む連結基であることが好ましい。最も好ましいのは、 $-NHCO-$ 基、もしくは $-CONH-$ 基である。なお、 E_a と E_b 、 L_{1a} と L_{1b} 、そして L_{2a} と L_{2b} とが、それぞれ、互いに同一の基であることが有利である。

【0020】本発明はまた、前記式(1)もしくは(2)で表わされる化合物からなる酸化還元活性を有する縫い込み型インターカレータにもある。この縫い込み型インターカレータは、特にオリゴヌクレオチド試料もしくはポリヌクレオチド試料の分析のための電気化学的分析法に有利に用いられる。

【0021】本発明の縫い込み型インターカレータは、下記オリゴヌクレオチド試料もしくはポリヌクレオチド試料の分析のための電気化学的分析法に特に有利に用いられる。

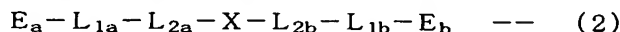
(1) 電極基板の表面に備えられた一群のヌクレオチド

誘導体もしくはその類縁体からなるプローブ分子と、該プローブ分子と相補的な関係にあるオリゴヌクレオチド試料もしくはポリヌクレオチド試料とを水性媒体と縫い込み型インターカレータの存在下でハイブリダイズさせて、該縫い込み型インターカレータが挿入された、該プローブ分子とオリゴヌクレオチド試料もしくはポリヌクレオチド試料とのらせん構造体などの複合体を形成させる工程、そして上記電極基板に電位を付与し、これにより発生する電流を検知する工程を含むオリゴヌクレオチド試料もしくはポリヌクレオチド試料の分析方法。

【0022】(2) 電極基板の表面に備えられた一群のヌクレオチド誘導体もしくはその類縁体からなるプローブ分子と、該プローブ分子と相補的な関係にあるオリゴヌクレオチド試料もしくはポリヌクレオチド試料とを水性媒体の存在下でハイブリダイズさせ、次いで縫い込み型インターカレータを接触させることにより、該縫い込み型インターカレータが挿入された、該プローブ分子とオリゴヌクレオチド試料もしくはポリヌクレオチド試料とのらせん構造体などの複合体を形成させる工程、そして上記電極基板に電位を付与し、これにより発生する電流を検知する工程を含むオリゴヌクレオチド試料もしくはポリヌクレオチド試料の分析方法。

【0023】上記の分析方法に於いて、本発明の縫い込み型インターカレータを用いると、電極基板付与する電位として、100乃至400mVの範囲内の相対的に低い電位が利用できる。

【0024】なお、本発明の縫い込み型インターカレータは、一群のヌクレオチド誘導体もしくはその類縁体からなるプローブ分子が備えられた電極基板と組合わせた分析キットとして利用することもできる。上記の、ヌク



【0030】式(1)および式(2)において、Xは、置換基を有していてもよい二価の環状基を表す。二価の環状基としては、平面性を有する環状基であることが好ましく、二つの窒素原子に結合手を有するナフタレンジイミド基、2位と6位、もしくは1位と5位(好ましくは2位と6位)とに結合手を有するアントラセン基、アントラセン基と同じ位置に結合手を有するアントラキノ基、2位と6位とに結合手を有するフルオレン基、2位と6位とに結合手を有するピフェニレン基、2位と7位とに結合手を有するフェナントレン基、および2位と7位とに結合手を有するピレン基からなる群より選ばれる環状基であることが好ましく、二つの窒素原子に結合手を有するナフタレンジイミド基であることが特に好ましい。置換基としては、水素原子、ハロゲン原子(F、Cl、Br等)、あるいは炭素原子数1乃至6のアルキル基であることが好ましいが、水素原子であることが好ましい。炭素原子数1乃至6のアルキル基としては、メチル基、エチル基、もしくはn-プロピル基であることが好ましい。

レオチド誘導体もしくはその類縁体の代表例としては、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、もしくはペプチド核酸を挙げることができる。

【0025】

【発明の実施の形態】本発明の発明者は、公知の導電性縫い込み型インターカレータを用いてのDNA断片試料の電気化学的検出操作において必要となる高い電位は、酸化還元活性を持ち、共役系を有する導電性フェロセン分子などの導電性基の共役系が、アミド結合部分などの π 結合系にまで拡大した共役系を形成するため、導電性基における移動性電子密度が低下することに関連があるという推定のもとに、導電性基の共役系をリンカー部分にまで拡大させないことにより、検出操作において必要な電位の低下が実現できるのではないかと期待して、そのような化学構造の化合物を合成し、その化合物を導電性縫い込み型インターカレータと使用して、DNA断片試料の電気化学的検出操作を実施したところ、その期待通りの低電圧(低電圧)で電流検出が可能になった。本発明は、上記の新規な知見に基づいて完成されたものである。

【0026】本発明において導電性縫い込み型インターカレータとして有利に用いられる化合物は、下記式

(1) で表わされる化合物である。

【0027】



【0028】本発明において導電性縫い込み型インターカレータとして特に有利に用いられる化合物は、下記式(2)で表わされる化合物である。

【0029】

【化8】

【0031】前記式(1)において、 L_a および L_b は、互いに独立に、それぞれが E_a および E_b の共役系が延長される共役系を形成することのない連結基であって、少なくとも一方の連結基が、本化合物に水溶性を付与する部位を有する連結基もしくは水溶性を付与する部位に変換し得る部位を有する連結基である。ここで、「水溶性を付与する部位に変換し得る部位」とは、たとえば、メチル基を置換基として有するイミノ基のように、硫酸などの酸と接触した場合に、硫酸塩部位に変換され、水溶性を示すように変化する部位を有する。勿論、「本化合物に水溶性を付与する部位」に塩部分のような荷電部分を持っていたとしてもよい。

【0032】 L_a および L_b は、互いに独立に、 E_a および E_b に隣接する側に、置換基を有していてもよい炭化水素基(前記式(2)の L_{1a} と L_{1b} に相当する基)を有し、一方、Xに隣接する側に炭素元素以外の元素を含む連結基(前記式(2)の L_{2a} と L_{2b} に相当する基)とからなる連結基であることが好ましい。従って、 L_a および L_b は、それぞれ、前記式(2)の $-L_{1a}-L_{2a}-$

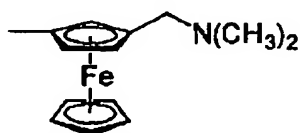
50 $-L_{1b}-L_{2b}-$

そして $-L_{2b}-L_{1b}-$ に該当する連結基であることが望ましい。ここで、 L_{1a} と L_{1b} は、互いに独立に、置換基を有していてもよい炭素原子数が1乃至6のアルキレン基あるいは置換基を有していてもよい炭素原子数が2乃至6のアルケニレン基であることが好ましく、一方、 L_{2a} と L_{2b} とは、互いに独立に、N、O、もしくはSを含む連結基であることが望ましい。

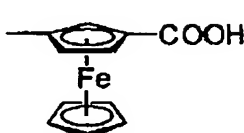
【0033】 L_{1a} および L_{1b} の置換基としては、ヒドロキシル基、ハロゲン原子、カルボキシル基、アミノ基、シアノ基、ニトロ基、ホルミル基、ホルミルアミノ基、炭素原子数が1乃至6のアルキル基、炭素原子数が1乃至6のアルキルアミノ基、炭素原子数が1乃至6のハロゲン化アルキル基、炭素原子数が5乃至7のシクロアルキルアミノ基、炭素原子数が2乃至12のジアルキルアミノ基、炭素原子数が6乃至12のアリール基、炭素原子数が1乃至6のアルキル基を有する炭素原子数が7乃至18のアラルキル基、1乃至6のアルキル基を有する炭素原子数が7乃至18のアラルキルアミノ基、炭素原子数が2乃至7のアルカノイル基、炭素原子数が2乃至7のアルカノイルアミノ基、炭素原子数が3乃至10のN-アルカノイル-N-アルキルアミノ基、アミノカルボニル基、炭素原子数が2乃至7のアルコキシカルボニル基、S、NおよびOからなる群より選ばれるヘテロ原子を1乃至4個含む炭素原子数2乃至10の複素環基、並びに置換基として炭素原子数1乃至6のアルキル基、炭素原子数1乃至6のアルコキシ基、もしくはハロゲン原子を1乃至5個有していてもよい環構成炭素原子数の数が6乃至12のアリール基からなる群より選ばれる原子もしくは基である。置換基の数は、炭素原子数が1乃至6のアルキレン基では、1乃至12個であることが好ましく、1乃至3個であることが特に好ましい。炭素原子数が2乃至6のアルケニレン基については、その数は1乃至10個であることが好ましく、1乃至3個であることが特に好ましい。

【0034】 L_{2a} と L_{2b} とは、互いに独立に、それぞれ、置換基を有していてもよい、アミド結合基、エステル結合基、エーテル結合基、チオエーテル結合基、ジイミド結合基、チオジイミド結合基、チオアミド結合基、イミノ結合基、カルボニル結合基、チオカルボニル結合基および1, 4-ピペラジニル基からなる群より選ばれ

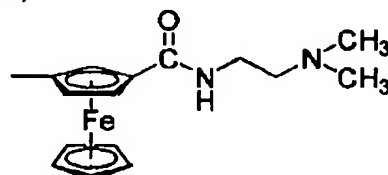
(F1)



(F2)



(F3)



【0039】本発明の縫い込み型インターカレータとして有利に用いることのできる化合物は、例えば、公知のジアミン化合物を原料として、公知の方法（特開平9-288080号公報）に準じる製造方法によって簡便に

る基を一個もしくは複数個含む連結基であることが好ましく、特に好ましいのはアミド基（ $-NHCO-$ 基、もしくは $-CONH-$ 基）である。

【0035】 L_{2a} と L_{2b} の置換基の例としては、炭素原子数が1乃至3のアルキル基、炭素原子数が2乃至4のアシル基、炭素原子数が6乃至20のアリール基および炭素原子数が1乃至3のアルキル基を有する炭素原子数が7乃至23のアラルキル基からなる群より選ばれる基で置換されていてもよい。炭素原子数が1乃至3のアルキル基としては、メチル基もしくはエチル基であることが好ましく、メチル基であることが特に好ましい。炭素原子数が2乃至4のアシル基としては、アセチル基であることが好ましい。炭素原子数が6乃至20のアリール基としては、フェニル基もしくはナフチル基であることが好ましく、フェニル基であることが特に好ましい。炭素原子数が1乃至3のアルキル基を有する炭素原子数が7乃至23のアラルキル基としては、ベンジル基であることが好ましい。

【0036】 L_{2a} と L_{2b} がイミノ結合基である場合、その置換基としては、メチル基であることが特に好ましい。従って、 L_{2a} と L_{2b} は、それぞれ独立に、N-メチルルージ（n-プロピレニル）イミノ基、1, 4-ジ（n-プロピレニル）-ピペラジニル基であることがさらに好ましく、N-メチルルージ（n-プロピレニル）イミノ基であることが特に好ましい。

【0037】 E_a および E_b は、酸化還元活性を有し、これによって導電性を付与する基であり、互いに独立に、置換基を有していてもよい、一つ以上の結合手を持つメタロセン、2, 2'-ビピリジン錯体、シクロブタジエン錯体、シクロペンタジエニル錯体、1, 10-フェナントロリン錯体、トリフェニルホスフィン錯体、カテコールアミン、あるいはビオローゲンなどであることが好ましい。置換基を有していてもよい一つの結合手を持つフェロセンであることが特に好ましい。 E_a および E_b は互いに同一の基であることが好ましい。次に、置換基を有するフェロセンの具体例を示す。置換基の位置は、シクロペンタジエニル基の何れの位置であつてもよい。

【0038】

【化9】

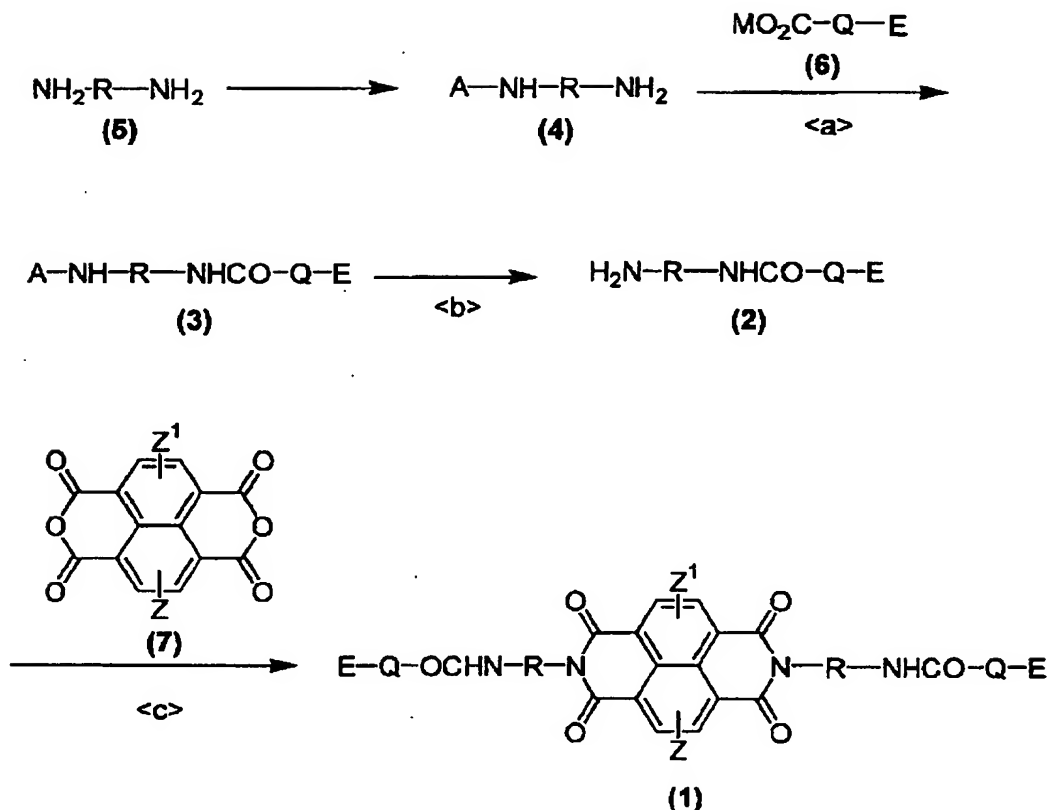
製造することができる。

【0040】また、本発明の化合物は、公知のジアミン化合物を出発物質とする下記の式で代表される合成ルートによっても安価に、かつ収率良く製造することができ

る。

【0041】

【化10】



【0042】上記合成ルートは、反応<a>、、および<c>からなる。公知のジアミン化合物を二種類以上使用し、ナフタレンジイミド構造（コア）に対して互いに異なるリンカー部分を縮合させてもよいが、本合成ルートでは、代表的な製造方法を示すこととする。

【0043】以下、それぞれの反応について分説する。

【0044】上記合成ルートの（4）の化合物：A-NH-R-NH₂は、（5）で表わされる公知のジアミンから、公知の方法（Green T. W., Wuts. P. G. M, Protective Groups in Organic Synthesis (2nd Edition, Wiley, New York, 1991, 315-345, 349-358) に準じる方法を利用して合成することができる。

【0045】Aは、炭素原子数が2乃至5のアシル基、炭素原子数が2乃至5のアルコキシカルボニル基、および置換基を有していてもよいベンゾイル基もしくはベンジルオキシカルボニル基からなる群より選ばれる基であることが好ましく、アセチル基、t-ブチルカルボニル基（ピンバロイル基）、t-ブトキシカルボニル基、もしくは置換基を有していてもよいベンジルオキシカルボニル基であることが特に好ましい。ベンゾイル基もしくはベンジルオキシカルボニル基が有していてもよい置換基としては、ハロゲン原子、ヒドロキシ基、炭素原子数が1乃至6のアルキル基、および炭素原子数が1乃至6のアルコキシ基からなる群より選ばれる原子もしくは基を挙げることができる。置換基の数は、1乃至5個である

ことが好ましく、1個であることが特に好ましい。

【0046】（4）の保護アミンは、一般的には、ジアミン化合物（5）に、Aに対応する酸ハライド、もしくはAに対応する酸無水物を反応させることによって得ることができる。Aに対応する酸ハライド、もしくはAに対応する酸無水物としては、ベンゾトリアゾール-1-イル-オキシ（OBt）基、スクシンイミジルオキシ（OSu）基、3-チアゾリジン-2-チオン基等を脱離基として有する反応試薬であることが好ましい。このような試薬としては、3-ベンジルオキシカルボニル-1, 3-チアゾリジン-2-チオンを用いることが特に好ましい。上記反応試薬に対して、ジアミン（5）を過剰量加えることが好ましく、その割合は、3乃至10倍モルの範囲にあることが特に好ましい。

【0047】反応は、有機塩基もしくは無機塩基を用いて行なってもよい。有機塩基としては、ピリジン、トリエチルアミン、ジイソプロピルエチルアミン等を挙げることができる。無機塩基としては、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、炭酸水素ナトリウム、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム等を挙げることができる。塩基の添加量の割合は、酸ハライド等の反応試薬に対して、0.1倍乃至大過剰モルの範囲にあることが好ましく、1乃至10倍モルの範囲にあることが特に好ましい。

【0048】反応は、溶媒中にて実施することが好ましいが、無溶媒で実施することもできる。溶媒としては、

原料もしくは生成物の全部あるいは一部を溶解することができ、かつ、反応に実質的に不活性の溶媒であれば何れの溶媒であってもよい。具体的には、アルコール類

(例えば、メタノール、エタノール、イソプロピルアルコール、エチレングリコール等)、アミド類(例えば、ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド、アセトアミド、N-メチルピロリドン等)、ニトリル類(例えば、アセトニトリル、n-ブチロニトリル)、エーテル類(例えば、エチレングリコールモノメチルエーテル、エチレングリコールモノエチルエーテル、テトラヒドロフラン、ジオキサン等)、ジメチルスルホキシド、スルホランおよび水を挙げることができる。これらの溶媒を二種類以上混合して用いてもよい。反応は、冷却下でも加熱下でも行うことができるが、その温度は、-50乃至150℃の範囲にあることが好ましく、-10乃至100℃の範囲にあることがさらに好ましく、0乃至50℃の範囲にあることが特に好ましい。

【0049】(3)の化合物： $A-NH-R-NHCO-Q-E$ は、(4)の保護アミン化合物と、 MO_2C-Q-E 、あるいは $M^1OC-Q-E$ とを縮合させることによって製造することができる(反応<a>)。M¹は、水素原子、アルカリ金属原子(ナトリウム原子、カリウム原子等)、あるいは窒素原子に結合手を有するイミド基を表す。窒素原子に結合手を有するイミド基としては、スクシンイミド基、フタルイミド基、グルタルイミド基等を挙げることができる。M¹は、活性基を表し、ハロゲン原子、 $-SO_2Cl$ 基、あるいは後述する縮合剤との反応中間体の該当する基であることが好ましい。

【0050】反応<a>は、アミノ基とカルボン酸基との縮合反応である。縮合反応は、Larock R. C., Comprehensive Organic Transformations (VCH, New York, 1989, 972-976)に記載されている方法により行うことができる。縮合反応は、縮合剤を用いて行うことが好ましい。縮合剤としては、1, 3-ジシクロヘキシルカルボジイミド、1-エチル-3-(3'-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド等を用いることが好ましい。反応は、溶媒の存在下で行うことが好ましい。溶媒としては、原料もしくは生成物の全部あるいは一部を溶解することができ、かつ、反応に実質的に不活性の溶媒であれば何れの溶媒であってもよい。具体的には、前述の反応<a>で示した有機溶媒に加え、ハロゲン系溶媒(ジクロロメタン、クロロホルム、1, 2-ジクロロエタン等)、およびエステル類(酢酸エステル等)を挙げることができる。これらの有機溶媒を混合して用いてもよく、水、あるいは水とこれらの有機溶媒との混合溶媒も好ましく用いることができる。この反応では、(4)の化合物に対して、例えば、(6)のカルボン酸を過剰量加えることが好ましく、その割合は1乃至2倍モルの範囲にあることが好ましい。また、(4)の化合物に対しては、 $M^1OC-Q-E$ の化合物を、過剰量加えること

が好ましく、その割合は、1乃至3倍モルの範囲にあることが好ましい。

【0051】縮合剤として、1, 3-ジシクロヘキシルカルボジイミド、1-エチル-3-(3'-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド等を用いる場合には、更に、酸性の添加剤もしくは塩基性の添加剤を用いることができる。酸性の添加剤としては、N-ヒドロキシスクシンイミド、N-ヒドロキシベンゾトリアゾール、もしくは3, 4-ジヒドロキシ-4-オキソ-1, 2, 3-ベンゾトリアジンをを用いることが好ましい。塩基性の添加剤としては、第三アミン、例えば、トリエチルアミン、ピリジン、もしくは4-ジメチルアミノピリジンを用いることが好ましい。添加剤の添加量は、縮合剤に対して、0.1倍乃至大過剰モルの範囲にあることが好ましく、1乃至3倍モルの範囲にあることが特に好ましい。反応は、冷却下でも加熱下でも行うことができるが、その温度は、-50乃至150℃の範囲にあることが好ましく、-10乃至100℃の範囲にあることがさらに好ましく、0乃至50℃の範囲にあることが特に好ましい。

【0052】反応は、アミノ基の脱保護反応である。保護基Aにより脱保護の条件を決定する。一般的には、Protective Groups in Organic Synthesisに記載されている条件を用いることができる。その中でも、ヨードトリメチルシランを用いる方法が特に好ましい。この反応は、溶媒中にて実施することが好ましいが、無溶媒で実施することもできる。溶媒としては、原料もしくは生成物の全部あるいは一部を溶解することができ、かつ、反応に実質的に不活性の溶媒であれば何れの溶媒であってもよい。具体的には、ハロゲン系溶媒(例えば、ジクロロメタン、ジクロロエタン等)、ニトリル類(例えば、アセトニトリル、n-ブチロニトリル等)、エーテル類(テトラヒドロフラン、ジオキサン等)、芳香族系溶媒(トルエン、ベンゼン等)、およびこれらの混合溶媒を挙げることができる。この反応では、(3)の化合物に対してヨードトリメチルシランを過剰量加えることが好ましく、その割合は1乃至10倍モルの範囲にあることが好ましい。反応は、冷却下でも加熱下でも行うことができるが、その温度は、-50乃至150℃の範囲にあることが好ましく、-10乃至100℃の範囲にあることがさらに好ましく、0乃至50℃の範囲にあることが特に好ましい。

【0053】反応<c>は、コア部分に相当するナフタレンジイミド構造(7)に、(2)の化合物を側鎖として脱水縮合させ、(1)の化合物を得る反応である。コア部分に相当するナフタレンジイミドの原料としては、一般的に、1, 4, 5, 8-ナフタレン四カルボン酸二無水物を用いることが好ましい。反応は、原料もしくは生成物の全部あるいは一部を溶解することができ、かつ、反応に実質的に不活性の溶媒であることを条件に、

前述の反応<a>、および<c>で示した有機溶媒あるいはこれらの混合溶媒を用いることができる。反応では、1, 4, 5, 8-ナフタレンテトラカルボン酸二無水物に対して、(2)の化合物を2当量以上加えることが好ましい。使用する溶媒によっては、(2)の化合物の量は2当量以下であってもよい。反応は、冷却下でも加熱下でも行うことが、0℃乃至使用溶媒の沸点の温度範囲にて行なうことが特に好ましい。

【0054】次に、本発明の縫い込み型インターカレータを用いてDNA断片試料などの核酸断片試料（ポリヌクレオチド試料あるいはオリゴヌクレオチド試料）を検出する方法について説明する。

【0055】本発明の核酸断片試料の検出方法は、下記の工程を含む。

(1) 電極表面にヌクレオチド誘導体もしくはその類縁体であるプローブ分子を固定した電気化学分析素子に、核酸断片試料が溶解もしくは分散している水性液を、前記記載の本発明の縫い込み型インターカレータの存在下に接触させて、プローブ分子に対して相補性を有する核酸断片試料とを結合させ、二本鎖複合体を形成させると共に、該複合体に縫い込み型インターカレータを挿入させる工程を実施する。ここで、電気化学分析素子とは、基板表面に区画された、導電性を付与された一つまたは複数の領域のそれぞれにプローブがその一端で固定された構造を代表とする分析素子をいう。そして、(2) 電気化学分析素子の導電性部分、好ましくは電極に電位を印加し、分析素子の電極と対極との間を、縫い込み型インターカレータを介して流れる電流量を測定する工程を実施する。なお、(1)の工程において、先にプローブ分子と核酸断片試料との複合体を形成し、ついで縫い込み型インターカレータに接触させて、複合体にインターカレータを挿入することもできる。

【0056】基板表面上に区画された一つまたは複数の領域とは、導電性を持たない基板上に配置された領域をいう。領域が複数個である場合には、それらは互いに接しないように、かつ規則的に配置されていることが好ましい。基板表面に区画された一つまたは複数の領域は、プローブ分子の固定および導電性の付与のため、その表面が予め処理されている。金、炭素、グラシーカーボン等で処理されていることが好ましく、金で蒸着処理されていることが特に好ましい。基板表面上に区画された一つまたは複数の領域には、金、炭素等で表面処理をする前に、電荷を有する親水性の高分子物質等からなる層や架橋剤からなる層を設けてもよい。このような層を設けることによって、表面処理後の領域の凹凸を軽減することができる。従って、基板表面に区画された、導電性を付与された一つまたは複数の領域とは、表面処理がなされた導電性を有する領域である。

【0057】基板としては、電気絶縁性の疎水性担体、あるいは電気絶縁性の低親水性の担体であることが好ま

しい。また、その表面が凹凸を有する平面性の低いものであっても好ましく用いることができる。基板の材質としては、ガラス、セメント、陶磁器等のセラミックスもしくはニューセラミックス、ポリエチレンテレフタレート、酢酸セルロース、ビスフェノールAのポリカーボネート、ポリスチレン、ポリメチルメタクリレート等のポリマー、シリコン、活性炭、多孔質ガラス、多孔質セラミックス、多孔質シリコン、多孔質活性炭、繊維物、不織布、濾紙、短繊維、メンブレンフィルター等の多孔質物質などを挙げることができる。多孔質物質の細孔の大きさは、2乃至1000nmの範囲にあることが好ましく、2乃至500nmの範囲にあることが特に好ましい。基板の材質は、上記記載の各種ポリマー、ガラスもしくはシリコンであることが特に好ましい。これは、表面処理の容易さや電気化学的方法による解析の容易さによるものである。基板の厚さは、特に限定されないが、板状である場合には、100乃至10000μmの範囲にあることが好ましい。

【0058】導電性を有する一つまたは複数の領域が備えられた基板としては、文献(Sosnowski, R. G. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 1119-1123 (1997))に記載のシリコンチップのような、基板表面に電極の一つまたは複数配置したものも好ましく用いることができる。電極としては、金属、合金、金属酸化物、半導体等を挙げることができる。電極の他には、導線であってもよく、プリント配線基板のように、電極や導線が基板上の印刷されてなるものであってもよい。

【0059】プローブ分子の固定方法としては、公知の方法を用いることができる。基板表面に区画された一つまたは複数の領域が金で蒸着処理されている場合には、オリゴヌクレオチドなどのプローブ分子の5'もしくは3'末端にメルカプト基を導入し、金とイオウとの配位結合を介して、オリゴヌクレオチドを当該領域に固定する。オリゴヌクレオチドにメルカプト基を導入する方法は、文献(M. Maeda et al., Chem. Lett., 1805~1808 (1994) および B. A. Connolly, Nucleic Acids Res., 13, 4484 (1985))に記載されている。基板表面に区画された一つまたは複数の領域がグラシーカーボンで塗布処理されている場合には、そのグラシーカーボンを過マンガン酸カリウムで酸化することによって、該領域にカルボン酸基が導入されるため、オリゴヌクレオチドは、アミド結合により該領域に固定される。実際の固定化方法については、文献(K. M. Millan et al., Analytical Chemistry, 65, 2317~2323 (1993))に詳細が記載されている。

【0060】プローブ分子とし用いるオリゴヌクレオチドあるいはポリヌクレオチドは、DNA断片およびRNA断片、あるいは合成されたオリゴヌクレオチドおよび合成されたポリヌクレオチドの何れも用いることができる。本発明に従う検出方法では、基板上の領域に固定されるプローブ分子が塩基配列既知のオリゴヌクレオチド

あるいはポリヌクレオチドであってもよく、あるいは検知対象の核酸断片試料がプローブ分子であってもよい。以下、基板上の領域に固定するプローブ分子が塩基配列が既知のオリゴヌクレオチドあるいはポリヌクレオチドである場合を例にして説明する。

【0061】プローブ分子として用いられるヌクレオチド誘導体もしくはその類縁体（例えば、PNA）は、目的によって二通りに分けることができる。遺伝子の発現を調べるためには、cDNA、cDNAの一部、EST等のポリヌクレオチドを使用することが好ましい。これらのポリヌクレオチドは、その機能が未知であってもよいが、一般的にはデータベースに登録された配列を基にしてcDNAのライブラリー、ゲノムのライブラリーあるいは全ゲノムをテンプレートとしてPCR法によって増幅して調製する。PCR法によって増幅しないものも好ましく使用することができる。また、遺伝子の変異や多型を調べるには、標準となる既知の配列をもとにして、変異や多型に対応する種々のオリゴヌクレオチドを合成し、これを使用することが好ましい。塩基配列の分析の場合には、 4^n （ n は、塩基の長さ）種のオリゴヌクレオチドを合成したものを使用することが好ましい。プローブ分子の塩基配列は、一般的な塩基配列決定法によって予めその配列が決定されていることが好ましい。プローブ分子は、2乃至50量体であることが好ましく、10乃至25量体であることが特に好ましい。

【0062】プローブ分子の固定は、プローブ分子が溶解あるいは分散された水性液を基板上の領域に点着して行うことが好ましい。点着後、所定の温度（好ましくは、室温）でそのまま数時間放置するとプローブ分子の一端が基板上の領域に固定される。点着後、必要に応じてインキュベーションを行ってもよい。点着の条件は、使用する基板の種類、大きさ等によって異なる。点着は、マニュアル操作によっても行うことができるが、DNAチップ作製装置に装備されたスポット装置を用いて行うことも好ましい。即ち、基板表面に区画された複数の領域に、スポット装置を用いてプローブ分子の水性液をスポットすることも好ましい。

【0063】上記の工程によって作製された電気化学分析素子の寿命は、プローブ分子としてcDNAが固定されたcDNA電気化学分析素子で数週間、合成オリゴヌクレオチドが固定されてなる電気化学分析素子ではさらに長期間である。これらの電気化学分析素子は、遺伝子発現のモニタリング、塩基配列の決定、変異解析、多型解析等に利用される。検出原理は、後述する、核酸断片試料とのハイブリダイゼーションである。

【0064】試料核酸断片としては、その配列や機能が未知であるDNA断片試料あるいはRNA断片試料を用いることが好ましい。試料核酸断片は、遺伝子発現を調べる目的では、真核生物の細胞や組織サンプルから単離することが好ましい。試料がゲノムならば、赤血球を除

く任意の組織サンプルから単離することが好ましい。赤血球を除く任意の組織は、抹消血液リンパ球、皮膚、毛髪、精液等であることが好ましい。試料がmRNAならば、mRNAが発現される組織サンプルから抽出することが好ましい。mRNAは、逆転写反応によりcDNAとすることが好ましい。一回のハイブリダイゼーションに必要なmRNA量としては、測定条件によって異なるが、数 μ g以下を用いることが好ましい。電気化学分析素子上のプローブ分子がオリゴヌクレオチドである場合には、核酸断片試料は低分子化しておくことが望ましい。

【0065】ハイブリダイゼーションは、核酸断片試料が溶解あるいは分散した水性液を、電気化学分析素子上に点着することによって通常実施する。ハイブリダイゼーションは、室温乃至70℃の温度範囲で、そして0.5乃至20時間の範囲で実施することが好ましい。ハイブリダイゼーション終了後、蒸留水、緩衝液、またはそれらと界面活性剤との混合溶液を用いて洗浄を行い、未反応の核酸断片試料を除去することが好ましい。界面活性剤としては、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）を用いることが好ましい。緩衝液としては、クエン酸緩衝液、リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、トリス緩衝液、グッド緩衝液等を用いることができるが、クエン酸緩衝液を用いることが特に好ましい。

【0066】ハイブリダイゼーションは、本発明の縫い込み型インターカレータの存在下にて行なうことができる。本発明の酸化還元活性を有する縫い込み型インターカレータは、一般的に、電気化学分析素子上のプローブ分子と核酸断片試料とで形成されるハイブリッドDNA（電気化学分析素子上のプローブ分子およびハイブリダイゼーションに供される核酸断片試料の種類を問わず、形成される二本鎖核酸断片を「ハイブリッドDNA」と呼ぶ）に高い特異性で結合するため、電極に電位を印加することにより、電極と対極との間で、インターカレータを介して流れる電流量を測定することによって、相補性を有する核酸断片試料を検出することができる。本発明のインターカレータを用いて核酸断片試料の検出操作を行なう場合には、印加する電位は100乃至400mVの範囲にあることが好ましく、200乃至400mVの範囲にあることが特に好ましい。本発明のインターカレータが挿入されたハイブリッドDNAは、一般的に、従来の代表的なインターカレータを用いた場合と異なり、印加した電位が上記の範囲にある場合に、ピーク電流値を示すからである。

【0067】本発明の縫い込み型インターカレータは、部分相補性を示す核酸断片試料を検出する方法にも使用することができる。部分相補性を示す核酸断片とは、プローブ分子Aに対して相補性を有する核酸断片試料をBとしたときに、核酸断片試料Bと塩基配列が部分的に同一性（即ち、部分的に非同源性）を示す核酸断片試料で

あって、通常、ミスマッチ試料との表現で表わされる。このような部分相補性を示す核酸断片試料としては、核酸断片試料Bに対して塩基欠損、塩基挿入等の塩基配列の変化を有する核酸断片試料を挙げることができる。部分相補性核酸断片の検出方法は、特に遺伝子診断分野での未知の異常遺伝子の探索・同定に重要な手法である。

【0068】本発明の縫い込み型インターカレータを用いて、部分相補性を示す核酸断片試料を検出する方法は、下記の工程を含む。

(1) 基板表面に区画された一つまたは複数の領域のそれぞれにプローブ分子がその一端で固定されてなる電気化学分析素子に、部分相補性を示す核酸断片試料（ミスマッチ試料）が溶解あるいは分散していると推定される水性液を接触させ、本発明の縫い込み型インターカレータの存在下にて、分析素子に電位を印加することにより、該分析素子と対極との間をインターカレータを介して流れる電流量を測定する工程；

(2) 電気化学分析素子に固定されているプローブ分子と完全な相補性を有する核酸断片試料（フルマッチ試料）を用いて（1）と同じ操作を行うことによって電流量を測定する工程；そして、

(3) 工程（1）と工程（2）のそれぞれで測定された電流量を比較することによって、工程（1）で用いた核酸断片試料が、工程（2）で用いた相補性核酸断片に対して部分相補性の核酸断片（ミスマッチ試料）であるかを検出する工程である。

【0069】上記のミスマッチ試料の検出方法で使用するプローブ分子、電気化学分析素子、印加電位、および検出原理については、前記記載の相補性を有する核酸断片試料の検出方法の記載と同様である。本発明の検出方法では、電気化学分析素子上に固定されているプローブ分子が部分相補性核酸断片であっても、あるいは水性液中に含まれる核酸断片試料が部分相補性核酸断片試料であってもよい。

【0070】上記の工程（1）および工程（2）でそれぞれ得られる電流値間には有意な差を生じるため、部分相補性核酸断片とのハイブリッドDNA（ここでは、ミスマッチ構造のハイブリッドDNA）を容易に検出することができ、このことは、部分相補性核酸断片を容易に検出することができることを示す。

【0071】本発明の核酸断片試料の検出キットは、電気化学分析素子、および本発明の縫い込み型インターカレータとを組み合わせてなり、遺伝子分野等の研究に携わる使用者によって特に有効に使用される。

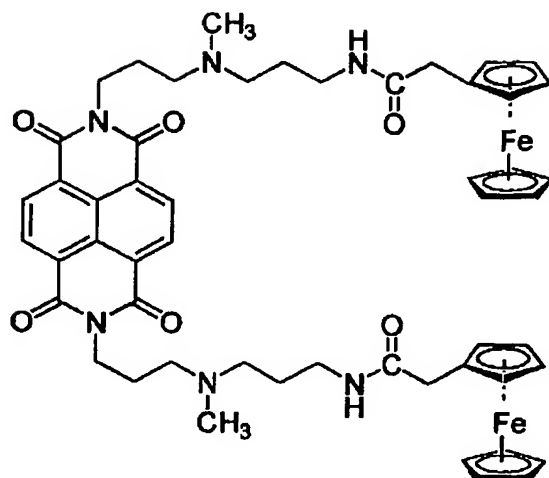
【0072】

【実施例】【製造例1】

N, N'-ビス（7-フェロセン酢酸アミド-4-メチル-4-アザヘプタチル）ナフタレンジイミドの製造

【0073】

【化1-1】



【0074】(1) N-1-ベンジロキシカルボニル-1, 7-ジアミノ-4-メチル-アザヘプタンの製造
ジ（3-アミノプロピル）-N-メチルアミン（73.0 g、500ミリモル）をジクロロメタン（400 mL）に溶解し、ここに、3-ベンジロキシカルボニル-1, 3-チアゾリジン-2-チオン（Synthesis, 1990, 27）（12.8 g、50ミリモル）のジクロロメタン（100 mL）溶液を滴下し、室温にて3時間攪拌した。次いで、生成した沈殿を濾別し、濾液に酢酸エチルと水とを加えて、酢酸エチルで二度抽出した。酢酸エチル層を水および飽和食塩水で洗浄後、1規定塩酸水溶液で二度抽出し、得られた水層を酢酸エチルで洗浄した。水層を冷却しながら、ここに、6規定水酸化ナトリウム水溶液を加えて、pHを9乃至10に調整し、酢酸エチルにて抽出した。酢酸エチル層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムにて乾燥後、溶媒を留去し、標題化合物を黄色油状物として得た（9.4 g、収率66%）。

【0075】 $^1\text{H-NMR}$ （300 MHz, CDCl_3 ） δ ：

1. 5.8～1.72（4H, m）
2. 2.0（3H, s）
2. 3.5～2.45（4H, m）
2. 6.4（2H, t）
3. 2.3～3.32（2H, m）
5. 1.5（2H, s）
7. 2.2～7.45（5H, m）

MS：FAB 280（ $\text{M}^+ + 1$ ）（マトリックス：m-ニトロベンゼン）

【0076】(2) N-1-ベンジロキシカルボニル-1-アミノ-7-フェロセン酢酸アミド-4-メチル-4-アザヘプタンの製造

上記（1）で得られたN-1-ベンジロキシカルボニル-1, 7-ジアミノ-4-メチル-アザヘプタン（3.0 g、11ミリモル）をジクロロメタン（30 mL）に溶解し、ここに、フェロセン酢酸（2.7 g、11ミリ

モル)、ピリジン(2mL)およびエチルN, N'-ジメチルアミノプロピルカルボジイミド塩酸塩(2.3g、12ミリモル)を加え、室温で3時間攪拌した。反応溶液に、塩化アンモニウム水溶液を加え、酢酸エチルで二度抽出し、酢酸エチル層を飽和食塩水で洗浄後、溶媒を留去した。得られた褐色油状物をアルミナカラムクロマトグラフィー(溶出溶媒:クロロホルム/メタノール=20/1)に付し、得られた結晶をヘキサン-酢酸エチルの混合溶媒で洗浄し、標題化合物をオレンジ色の結晶として得た(2.6g、収率91%)。

【0077】 $^1\text{H-NMR}$ (300MHz、 CDCl_3)
 δ :

1. 5.0~1.72 (4H, m)
2. 0.8 (3H, s)
2. 2.0~2.33 (4H, m)
3. 1.5~3.30 (4H, m)
3. 3.4 (2H, s)
4. 1.5 (5H, s)
4. 1.6 (4H, s)
5. 1.5 (2H, s)
5. 5.4 (1H, bs)
6. 4.4 (1H, bs)
7. 3.2~7.48 (5H, m)

【0078】(3) 1-アミノ-7-フェロセン酢酸アミド-4-メチル-4-アザヘプタンの製造

上記(2)で得られたN-1-ベンジロキシカルボニル-1-アミノ-7-フェロセン酢酸アミド-4-メチル-4-アザヘプタン(1.6g、3.0ミリモル)をアセトニトリル(30mL)に溶解し、室温で攪拌しながら、ここに、ヨウ化トリメチルシラン(1.25mL、8.8ミリモル)を滴下した。5分後、反応溶液に1規定塩酸水溶液と酢酸エチルを加え、1規定塩酸水溶液にて三度抽出し、水層を酢酸エチルで洗浄した。氷冷した水層に、2規定水酸化カリウム水溶液を加えてpH10とし、クロロホルムにて二度抽出した。有機層を飽和食塩水にて洗浄後、溶媒を留去し、標題化合物を褐色結晶として得た(1.0g、収率70%)。

【0079】 $^1\text{H-NMR}$ (300MHz、 CDCl_3)
 δ :

1. 4.8~1.62 (4H, m)
2. 0.9 (3H, s)
2. 2.5~2.35 (4H, m)
2. 7.1 (2H, t)
3. 2.2~3.33 (2H, m)
3. 3.5 (2H, s)
4. 1.0~4.21 (9H, m)
6. 7.5 (1H, bs)

【0080】(4) N, N'-ビス(7-フェロセン酢酸アミド-4-メチル-4-アザヘプチル)ナフタレンジイミドの製造

上記(3)で得られた1-アミノ-7-フェロセン酢酸アミド-4-メチル-4-アザヘプタン(0.95g、2.5ミリモル)をテトラヒドロフラン(50mL)に溶解し、室温で攪拌しながら、ここに、1, 4, 5, 8-テトラカルボン酸ナフタレン二無水物(0.3g、1.1ミリモル)を加えたのち7時間環流した。反応溶液を濾過した後、クロロホルムにて洗浄し、合わせた有機層から溶媒を留去して得られた残渣をアルミナクロマトグラフィー(溶出溶媒:クロロホルム:メタノール=15:1)に付し、得られた結晶を酢酸エチルで洗浄し、標題化合物を褐色結晶として得た(0.32g、収率30%)。

【0081】 $^1\text{H-NMR}$ (300MHz、 CDCl_3)
 δ :

1. 5.6~1.70 (8H, m)
1. 7.8~1.92 (4H, m)
2. 1.2 (6H, s)
2. 3.3~2.46 (8H, m)
3. 3.0~3.42 (4H, m)
- 20 3. 3.6 (4H, s)
4. 1.3 (10H, s)
4. 2.0 (8H, s)
6. 8.5 (2H, bs)
8. 8.0 (4H, s)

MS:FAB 975 (M+H) (マトリックス:m-ニトロベンゼン)

【0082】[実施例1]ハイブリッドDNAの検出

(1)電気化学分析素子の作製

面積が2.25mm²の金電極に、5'末端にメルカプトヘキシル基を有する100ピコモル/1 μ Lのチミンの20量体(dT₂₀)の水溶液(2 μ L)を滴下し、室温で1時間放置して電気化学分析素子を作製した。dT₂₀の調製、および固定化については、特開平9-288080号公報に記載の方法に従って行った。

(2)試料DNA断片の調製

試料DNA断片として、アデニンの20量体(dA₂₀)を上記公報に記載の方法に従って調製した。

【0083】(3)ハイブリッドDNAの検出

(1)で作製した電気化学分析素子の表面に、(2)で得たdA₂₀(70ピコモル)を含む10mMトリス緩衝液(pH7.5)溶液の2 μ Lを滴下し、25℃で20分インキュベートした。インキュベート後、分析素子表面を0.1Mリン酸二水素ナトリウム-リン酸水素二ナトリウム水溶液(pH7.0)にて洗浄し、未反応のdA₂₀を除去した。次いで、製造例1で得られた縫い込み型インターカレータ(50 μ M)を含む0.1M塩化カリウム-0.1M酢酸緩衝液(pH5.6)の混合溶液中に、洗浄後の分析素子を浸漬し、デファレンシャルパルスボルタメトリー(DPV)を、パルス振幅50mV、パルス幅50mS、印加電圧100乃至700mV

の範囲およびスキャン速度100mV/秒の条件にて測定した。応答電位260mVにおける電流量を求めた。また、試料DNA断片dA₂₀を滴下しない以外は上記と同様の操作を行って得られた電流量を基本値とし、上記測定によって得られた電流量の基本値からの変化量(%)を求めたところ、36%であった。

【0084】[比較例1] 縫い込み型インターカレータとして、前記特開平9-288080号公報に記載されている公知の代表的なインターカレータを用い、応答電位460mVにおける電流量を求める以外は実施例1と同様にして、電流量の変化量を求めたところ、38%であった。

【0085】実施例1および比較例1の結果より、本発明の縫い込み型インターカレータを使用した場合に、従来の代表的な縫い込み型インターカレータと使用した場合に比べて、約200mV低い電圧において、ほぼ同等の応答電流を得ることができることが分かる。また、試料DNA断片とのハイブリッドDNAの検出において、本発明の縫い込み型インターカレータを使用した場合に示す応答電流の変化率は、公知の縫い込み型インターカレータと使用した場合に示す応答電流の変化率とほぼ同じであることが分かる。

【0086】[実施例2] ミスマッチ構造のハイブリッドDNAの検出

(1) 電気化学分析素子の作製

dT₁₉G₁を用いる以外は、実施例1の(1)と同様にして、電気化学分析素子を作製した。

(2) ミスマッチ構造のハイブリッドDNAの検出

電気化学分析素子として、実施例1の(1)で作製した電気化学分析素子、および上記(1)の分析素子をそれぞれ用いる以外は実施例1と同様の操作を行って、印加

電圧200乃至400mVの範囲でDPVを測定し、260mVでの電流量の変化率を求めたところ、それぞれ、36%、20%であった。

【0087】実施例2の結果から、dT₁₉G₁を固定して作製された電気化学分析素子に、試料DNA断片d₂₀Aを接触させて得られるハイブリッドDNAは、ミスマッチ構造のハイブリッドDNAであり、本発明の新規縫い込み型インターカレータを用いて、260mVという低電圧の印加によって、フルマッチ構造のハイブリッドDNAとミスマッチ構造のハイブリッドDNAとの応答電流の差を求めることができることが分かる。

【0088】従って、電気化学分析素子上のプローブ分子と、このプローブ分子と完全な相補性を有する塩基配列(フルマッチ)を持つDNA断片試料とで形成されるハイブリッドDNAの応答電流の値が予め明らかとなっている場合に、本発明の新規縫い込み型インターカレータの使用および260mVの印加電圧の条件下において、試料DNA断片が、電気化学分析素子上のDNA断片と完全な相補性を有する塩基配列を持つものであることが容易に確認できることがわかる。

【0089】

【発明の効果】本発明の酸化還元活性を持つ縫い込み型インターカレータは、新規な導電性縫い込み型インターカレータであって、一般に、入手容易な試薬より簡便に合成することができるものである。核酸断片試料の検出において、本発明のインターカレータを用いた場合、従来の代表的なインターカレータを用いた場合より、低い印加電位にてピーク電流値を与えるため、本発明のインターカレータを使用することによって、電気化学分析素子の再利用回数を増加させ、検出精度や再現性を向上させることもできる。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷

識別記号

F I

テマコード(参考)

G 0 1 N 27/416

C 1 2 M 1/34

Z

33/483

C 1 2 N 15/00

A

33/58

G 0 1 N 27/30

3 5 1

// C 1 2 M 1/34

27/46

3 3 6 G

(72)発明者 竹中 繁織

福岡県古賀市舞の里4-23-21

(72)発明者 山下 健一

福岡県福岡市城南区堤団地17-104